

## 骨の複合糖質の生化学的研究

著者	増淵 正昭
号	764
発行年	1974
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/19073">http://hdl.handle.net/10097/19073</a>

氏 名（本籍）	まさ 増	ぶち 刈	まさ 正	あき 昭
学 位 の 種 類	医	学	博	士
学 位 記 番 号	医 博 第	7 6 4	号	
学位授与年月日	昭 和	4 9 年	3 月	2 6 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当			
研究科専門課程	東北大学大学院医学研究科 （博士課程）生理学系専攻			
学位論文題目	骨の複合糖質の生化学的研究			

（主 査）

論文審査委員 教授 吉 沢 善 作 教授 立 木 蔚

教授 菊 地 吾 郎

## 論文内容要旨

硬骨における複合糖質に関する研究は Roger らに始まり, Meyer その他の研究者により, コンドロイチン硫酸 A の分離, 同定がなされた。その後糖タンパクも含まれることが明らかになり, Herring らは, ウシの骨の EDTA 抽出物から, コラーゲン様物質, ムコタンパク, シアロ糖タンパク, コンドロイチン硫酸 A, およびコンドロイチン硫酸 A とシアロ糖タンパクが結合したものを分離, 同定した。さらに, アルブミンおよび酸性度の低い糖タンパクがかなり濃縮された形で存在し, これらも化骨に重要な役割をはたすと推定した。Burchard らは, ウサギ硬骨の EDTA 抽出物中にも, 上記と同様な複合糖質の存在することを報告した。著者は, 硬骨中における複合糖質の存在様式を再検討するため, 以下の実験を行なった。

### 実験方法

ウサギ大腿骨のアセトン乾燥粉末を, 40% EDTA 溶液 (pH 7.4) で 4°C, 2 日間抽出を行ない, 得られた抽出液を透析, 濃縮し, 緩衝化エタノールを加えた。生じた沈殿を再び EDTA 溶液にとかし, 105,000×g, 30 分間遠心し, 上清を透析, 濃縮し, 緩衝化エタノールを加えて, 粗複合糖質画分 I (E-Fr.) を得た。E-Fr. に含まれる個々の複合糖質の種類を確認するため, Pronase, Chondroitinase ABC 単独消化, および両者を組合せて消化を行なった。一方, 複合糖質に結合したタンパクを出来るだけ変性させないで分画精製するため, E-Fr. を OM-Sephadex C-25 処理後, OPC-セルロースカラムクロマトグラフィー, および E-Fr. を直接 DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィーで分画した。他方, EDTA 抽出残渣は, 6 M 尿素を用いて 4°C, 続いて, 60°C, 2 日間抽出を行なった。得られた各抽出液を透析, 凍結乾燥し, 複合糖質を含む 6 M 尿素 60°C 抽出物を粗複合糖質画分 II (H-UFr.) とした。H-UFr. は Collagenase - Pronase 消化を行ない, その消化産物を Sephadex G-25, G-100 のゲルろ過を行なってから, 素通り画分を DEAE-Sephadex A-50 のカラムクロマトグラフィーで分画した。上記の各方法で得られた個々の画分について, 電気泳動, 赤外線吸収スペクトル分析, 構成成分の定性, 定量分析を行なった。

### 実験結果および考察

E-Fr. は電気泳動で 4 つの画分に分かれた。すなわち, Fr. I として, 原点部分に残るもの, Fr. II として, ヒアルロン酸よりやや移動度の低いブロードなバンドを示すもの, Fr. III として, ヒアルロン酸とコンドロイチン硫酸 B との間に泳動するもの, Fr. IV として, コンドロイ

チン硫酸Aよりやや移動度の低いものに分かれた。複合糖質はFr.Ⅲに最も多く含まれ、Fr.Ⅳがこれにつづき、Fr.Ⅱ、Fr.Ⅰはその含量は極めて低かった。Fr.Ⅲ：Chondroitinase ABCで消化を受けず、Pronaseで消化を受け、約2/3のタンパク、ヘキソース、ウロン酸、シアル酸を失い、電気泳動的にやや移動度を増した。その消化で得られた物質はヘキソース36.2%（ガラクトースを主成分とし少量のマンノースを含む）、ヘキソサミン30.6%（グルコサミン：ガラクトサミン≒28:5）、フコース2.4%、シアル酸7.6%、硫酸6.6%を含んでおり、赤外線吸収スペクトルは6-硫酸の存在を示した。したがってこの物質は、硫酸化糖ペプチド（硫酸含量の少ないケラタン硫酸様物質）とみなされた。この種の物質が硬骨中に見出されたことは全く新しい知見である。さらにこの物質は、H-UFr.のCollagenase-Pronase消化産物からも単離され、ヘキソサミンに対する硫酸のモル比はE-Fr. から得られたものより高く、マトリックスにより強く組み込まれて存在するタイプのものと推定され、E-Fr.のものは、異化分解過程の初期のもの、あるいは、マトリックスにゆるく組み込まれて存在するものと推定された。Fr.Ⅳ：分析値および赤外線吸収スペクトルより、コンドロイチン硫酸Aを含むことが明らかとなった。コンドロイチン硫酸Aと結合するタンパク部には、ヘキソースや少量のシアル酸が含まれるので糖タンパクと推定され、Herringらの報告と同様、シアロ糖タンパクとの結合も考えられた。精製標品に含まれるヘキソサミンに対する硫酸のモル比は0.72とやや低く、組織におけるプロテオコンドロイチン硫酸Aの異化分解過程の初期の産物とも考えられた。一方H-UFr.のCollagenase-Pronase消化産物から精製した標品は硫酸含量も高く、マトリックスにより強く組み込まれたものとみなされた。Fr.Ⅱ：Pronase消化で検出されなくなり、分画精製すると2つの画分（D-2とD-3）に分かれた。D-3はシアル酸の含量が高く、シアロ糖タンパクとみなされたが、少量のコンドロイチン硫酸を結合していることも考えられた。一方、D-2は酸性度の低い糖タンパクとみなされた。Fr.Ⅰ：分析値、染色性などから、アルブミン様物質とみなされた。

## 結 言

ウサギ硬骨部に最も多く含まれる複合糖質は硫酸化糖タンパク（硫酸含量の少ないケラタン硫酸様物質がタンパクと結合したもので、コンドロイチン硫酸A画分（プロテオコンドロイチン硫酸Aとタンパクを結合していないコンドロイチン硫酸Aとの混合物）がこれにつづき、その他、シアロ糖タンパク、酸性度の低い糖タンパクやアルブミン様物質の存在が確認された。さらに、硬骨中の硫酸化糖タンパクやプロテオコンドロイチン硫酸Aには、マトリックスに強く組み込まれたタイプのものと、それらの異化分解の初期の産物、または、マトリックスにゆるく組み込まれたタイプのものとが存在することが明らかとなった。

## 審 査 結 果 の 要 旨

硬骨における複合糖質として、コンドロイチン硫酸Aと2～3の糖タンパクの存在が報告されていたが、その存在様式は十分解明されていない。

著者は硬骨の複合糖質の存在様式を再検討するため、ウサギ大腿骨を40% EDTAで抽出し、その抽出物をまずプロナーゼおよびコンドロイチナーゼABCで消化し、主要な複合糖質を確認した。次いで、抽出物をCM-Sephadex C-25処理、CPC-セルロースカラムクロマトグラフィー、DEAE-Sephadex A-50カラムクロマトグラフィーなどで分画・精製した。一方、EDTA抽出残渣は、6M尿素で抽出し、得られた複合糖質画分をコラゲナーゼとプロナーゼで消化し、消化産物をSephadex G-25, G-100のゲルろ過、次いでDEAE-Sephadex A-50のカラムクロマトグラフィーで分画した。これらの各方法で得られた個々の画分について、電気泳動法、赤外線吸収スペクトル分析、構成成分の定性、定量分析を行なった。その結果、ウサギ大腿骨の硬骨部に最も多く含まれる複合糖質は、硫酸化糖タンパク（硫酸含量の少ないケラタン硫酸様物質がタンパクと結合したもので、コンドロイチン硫酸A画分（プロテオコンドロイチン硫酸Aとタンパクの結合していないコンドロイチン硫酸Aとの混合物）がこれに次ぎ、その他、シアロ糖タンパク、酸性度の低い糖タンパクやアルブミン様物質の存在が確認された。さらに、硬骨中の硫酸化糖タンパクやプロテオコンドロイチン硫酸Aには、マトリックスに強く組み込まれたタイプのものと、それらの異化分解の初期の産物、または、マトリックスにゆるく組み込まれたタイプのものが存在することも明らかとなった。

以上の成績は、硬骨中の個々の複合糖質を分離、同定し、これまで知られていなかった硫酸化糖タンパクの存在を明らかにすると共に、硬骨における硫酸化糖タンパクとプロテオコンドロイチン硫酸Aの存在様式に重要な手がかりを与えたもので、結合組織研究への貢献は甚だ大である。

よって本論文は学位を授与するに値する。